

13. 4. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

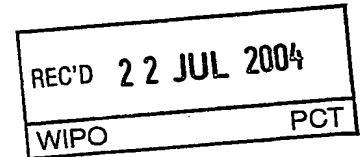
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 1 8 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 1 4 7 9 3
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 1 4 7 9 3]

出 願 人 独立行政法人 科学技術振興機構
Applicant(s):

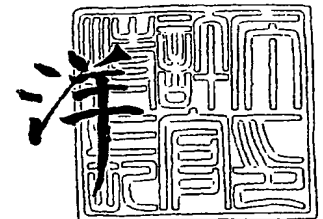


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 7 月 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-0032
【提出日】 平成15年 4月18日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A01K 67/027
C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区あかね台 2 - 3 0 - 8

【氏名】 田中 光一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区富士見町 7 - 4 アーバンハイツ豊田 5 0
4

【氏名】 原田 高幸

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100092783

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 浩

【電話番号】 03-3273-2611

【選任した代理人】

【識別番号】 100095360

【弁理士】

【氏名又は名称】 片山 英二

【選任した代理人】

【識別番号】 100093676

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 純子

【選任した代理人】

【識別番号】 100112726

【弁理士】

【氏名又は名称】 黒田 薫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 157061

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルタミン酸トランスポーターGLAST機能欠損マウス

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 内在性GLAST遺伝子の機能を欠損させた、正常眼圧緑内障のモデルとしてのGLASTノックアウトマウス。

【請求項 2】 内在性GLAST遺伝子の機能を欠損させたGLASTノックアウトマウスであって、

- 1) その眼圧が正常範囲にあり、かつ
- 2) その網膜神経節の細胞数が、野生型マウスに比べて減少している、

GLASTノックアウトマウス。

【請求項 3】 その眼圧が 21 mmHg 以下である、請求項 2 に記載のGLASTノックアウトマウス。

【請求項 4】 その網膜神経節の細胞数が、野生型マウスに比べて少なくとも 20% 減少している、請求項 2 に記載のGLASTノックアウトマウス。

【請求項 5】 その遺伝的背景が、C57BL/6系マウスの遺伝的背景と同一又は実質的に同一である、請求項 1 又は 2 に記載のGLASTノックアウトマウス。

【請求項 6】 内在性GLAST遺伝子領域内にネオマイシン耐性遺伝子が挿入されている、請求項 1 又は 2 に記載のGLASTノックアウトマウス。

【請求項 7】 内在性GLAST遺伝子の第 6 エキソンにネオマイシン耐性遺伝子が挿入されている、請求項 6 に記載のGLASTノックアウトマウス。

【請求項 8】 正常眼圧緑内障のモデルとしての、請求項 2 に記載のGLASTノックアウトマウスの使用。

【請求項 9】 内在性GLAST遺伝子の機能を欠損させたGLASTノックアウトマウスの作製方法であって、下記 1～6 の過程を含んで成る、作製方法：

- 1) 相同染色体上の 1 つの内在性GLAST遺伝子の機能を欠損させた任意のマウスのES細胞を得ること、
- 2) 過程 1 で得られたES細胞を用いて、該細胞を含んで成るキメラマウスを得ること、
- 3) 過程 2 で得られたキメラマウスを正常C57BL/6系マウスと交配して、ヘテ

ロ接合型ノックアウトマウスを得ること、

4) 過程 3 で得られたヘテロ接合型ノックアウトマウスを正常C57BL/6系マウスと交配して、ヘテロ接合型ノックアウトマウスを得ること、

5) 過程 4 に記載した交配を、少なくとも合計 5 回繰り返して、その遺伝的背景をC57BL/6系マウスに近づけたヘテロ接合型ノックアウトマウスを得ること、及び

6) 過程 5 で得られたヘテロ接合型ノックアウトマウス同志を交配して、ホモ接合型又はヘテロ接合型のGLASTノックアウトマウスを得ること。

【請求項 10】 過程 5 において、過程 4 に記載した交配を少なくとも合計 9 回繰り返す、請求項 9 に記載の作製方法。

【請求項 11】 請求項 9 に記載の作製方法を用いて作製した、ホモ接合型又はヘテロ接合型のGLASTノックアウトマウス。

【請求項 12】 請求項 1、2 及び 11 のいずれかに記載のGLASTノックアウトマウスを用いた、正常眼圧緑内障の予防及び／又は治療に有用な化合物のスクリーニング方法。

【請求項 13】 正常眼圧緑内障の予防及び／又は治療に有用な化合物のスクリーニング方法であって、

1) 請求項 1、2 及び 11 のいずれかに記載のGLASTノックアウトマウスに試験化合物を投与すること、

2) 野生型マウスに試験化合物を投与すること、

3) 上記の各マウスにおいて、投与前、及び投与してから一定期間後に、生存する視神経細胞の数量又機能を評価すること、及び

4) GLASTノックアウトマウスと野生型マウスの検査結果を比較して、試験化合物の有効性を評価すること
を含んで成る、スクリーニング方法。

【請求項 14】 生存する視神経細胞数又は視神経細胞機能を評価するために、網膜神経節の神経細胞数を計数し、及び／又は網膜電位を測定する、請求項 13 に記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、グルタミン酸トランスポーターの一種であるGLASTの機能が欠損しているGLASTノックアウトマウス及びその作製方法に関する。また、本発明は、該ノックアウトマウスの、正常眼圧緑内障モデルマウスとしての使用、及び該ノックアウトマウスを用いた、正常眼圧緑内障の予防及び／又は治療に有用な化合物のスクリーニング方法にも関する。

【0002】

【従来の技術】

正常眼圧緑内障は、緑内障のなかの一つのタイプに属するが、その有病率の高さから、最近特に注目されている疾患である。一般に緑内障とは、眼圧（眼球内の水圧）が高くなるために視神経が圧迫されて萎縮し、そのために視機能が障害を受け、視野が狭くなる疾患であり、そのまま放置しておくと、最終的には失明にいたる危険性が高い。他方、正常眼圧緑内障は、眼圧が正常範囲（ヒトでは通常10～21mmHg）にあるにもかかわらず、眼圧が高い緑内障と同様の所見（視神経の萎縮及び視野欠損）を呈する病態である。緑内障は、先進諸国では、糖尿病に次いで失明原因の第2位にランクされており、日本人では40歳以上の人の約3.5%に当たる約200万人が罹患しているが、近年の疫学調査では、その7割が正常眼圧緑内障であると報告されている。正常眼圧緑内障は、ゆっくりと進行して自覚症状も少ないため、早期発見も難しく、また現在のところ、更に眼圧を下げる以外、決め手となる治療法がない。

【0003】

近年、軽度かつ慢性的なグルタミン酸濃度の上昇によって誘発される網膜神経節細胞の変性脱落、すなわち神経細胞死が、緑内障や糖尿病性網膜症の原因の一つとして提唱されている（非特許文献1（Harada, T., et al. Proc Natl Acad Sci USA 95, 4663-4666, 1998）；非特許文献2（Harada, C. et al., Neurosci. Lett. 292, 134-136, 2000））。

哺乳類の中樞神経系において、グルタミン酸は主要な興奮性神経伝達物質の一つであり、脳の高次機能に重要な役割を果たしているが、その反面、グルタミン

酸の過剰な上昇が神経毒性を示し、各種の神経変性疾患や脳虚血後の遅延性神経細胞死を招くことが知られている。このグルタミン酸濃度を調節する機構の一つがグルタミン酸トランスポーターである。グルタミン酸トランスポーターは、神経終末から一旦放出されたグルタミン酸を細胞内に取り込み、シナプス間隙のグルタミン酸濃度を低く保つことを主要な役割とする機能分子である。

【0004】

現在、哺乳動物の脳内のグルタミン酸トランスポーターとしては、神経細胞に存在する型のEAAC1, EAAT4及びEAAT5 (Kanai, Y. & Heidiger, M.A., Nature 360, 467-471, 1992; Fairman, W.A., et al., Nature, 375, 599-603, 1995; Arrizal, J.E., et al., Proc Natl Acad Sci USA 94, 4155-4160, 1997、並にグリア細胞に存在する型のGLT1及びGLAST (別名GluT-1)が知られており (Pines, D. et al., Nature 360, 464-467, 1992; Mukainaka et al., Biochimica et Biophysica Acta 1244, 233-237, 1995; Tanaka, K., Neurosci. Res. 16, 149-153, 1993; 非特許文献3 (Tanaka, K., Neurosci. Lett. 159, 183-186, 1993); Storck, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10955-10959, 1992)、これらのグルタミン酸トランスポーターの機能異常と各種の神経細胞変性疾患との関連が知られている。

【0005】

このような状況の中で、GLASTノックアウトマウス (非特許文献4 (Watase, K. et al, Eur. J. Neurosci. 10, 976-988, 1998); 特許文献1 (特開平10-33087号)) を用いた実験から、GLASTが、網膜内のミュラー細胞に存在すること、そしてGLASTノックアウトマウスでは野生型と比較して、虚血負荷後の網膜損傷が著しく増悪することが明らかとなり、このことから、網膜のミュラー細胞に存在するGLASTが緑内障の発症に関与していることが示唆されている (非特許文献1 (Harada, T., et al. Proc Natl Acad Sci USA 95, 4663-4666, 1998))。しかし、このGLASTノックアウトマウスでは、虚血負荷をかけない限り、網膜組織の損傷は観察されておらず、これを正常眼圧緑内障のモデルに用いることはできない。

既に、緑内障の治療薬の開発やその発症機序の解明のために、緑内障モデル動

物として、遺伝的慢性緑内障モデルマウスや水負荷による高眼圧緑内障モデルウサギなどが存在するが、正常眼圧緑内障のモデル動物は、これまで全く知られていない。また、正常眼圧緑内障とGLASTとの関係を指摘している報告はなく、正常眼圧緑内障の発症機序は依然として不明である。

【0006】**【特許文献1】**

特開平10-33087号公報

【非特許文献1】

Harada, T., et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 4663-4666, 1998

【非特許文献2】

Harada, C. et al., Neurosci. Lett. 292, 134-136, 2000

【非特許文献3】

Tanaka, K., Neurosci. Lett. 159, 183-186, 1993

【非特許文献4】

Watase, K. et al, Eur. J. Neurosci. 10, 976-988, 1998

【非特許文献5】

Hagiwara, T., et al., Genomics 33, 508-515, 1996

【0007】**【発明が解決しようとする課題】**

従って、正常眼圧緑内障モデル動物が得られれば、該疾患の治療に有効な治療薬の開発のために、その治療方法の確立のために、そしてまた該疾患の原因や発症機序の解明のために、極めて有益であると期待される。しかしながら、現在、正常眼圧緑内障モデル動物は知られておらず、従って、医学分野または医薬分野において、このようなモデル動物が切望されていた。

【0008】**【課題を解決するための手段】**

本発明者は、従来から存在するグルタミン酸トランスポーター遺伝子GLASTの機能が欠損した通常のノックアウトマウス（GLASTノックアウトマウス）を改良した結果、眼圧が正常範囲内にあるにもかかわらず、網膜神経節細胞が変性脱落

し、その数が著しく減少した改良型GLASTノックアウトマウスを得ることができた。そして、このノックアウトマウスは、正常眼圧緑内障のモデルマウスとして有用であることが判明した。

【0009】

従って、本発明は、内在性GLAST遺伝子の機能を欠損させた、正常眼圧緑内障のモデルとしてのGLASTノックアウトマウス、特に、1) その眼圧が正常範囲にあり、かつ2) その網膜神経節の細胞数が、野生型マウスに比べて減少している、GLASTノックアウトマウスを提供する。

本発明では、該GLASTノックアウトマウスの眼圧は、通常21 mmHg以下、例えば10～21 mmHgである。また、該GLASTノックアウトマウスの網膜神経節の細胞数は、野生型マウスに比べて少なくとも20%減少している。

本発明では、好ましくは、該GLASTノックアウトマウスの遺伝的背景は、C57BL/6系マウスの、例えばC57BL/6J系マウスの遺伝的背景と同一又は実質的に同一である。

具体的には、本発明は、内在性GLAST遺伝子領域内に、例えばその第6エクソンに、ネオマイシン耐性遺伝子が挿入されているGLASTノックアウトマウスを提供する。

本発明はまた、この様なGLASTノックアウトマウスの、正常眼圧緑内障のモデルマウスとしての使用をも提供する。

【0010】

別の態様として、本発明は、内在性GLAST遺伝子の機能を欠損させたGLASTノックアウトマウスの作製方法を提供する。この作製方法は、下記1～6の過程を含んで成る：

- 1) 相同染色体上の1つの内在性GLAST遺伝子の機能を欠損させた任意のマウスのES細胞を得ること、
- 2) 過程1で得られたES細胞を用いて、該細胞を含んで成るキメラマウスを得ること、
- 3) 過程2で得られたキメラマウスを正常C57BL/6系マウスと交配して、ヘテロ接合型ノックアウトマウスを得ること、

4) 過程3で得られたヘテロ接合型ノックアウトマウスを正常C57BL/6系マウスと交配して、ヘテロ接合型ノックアウトマウスを得ること、

5) 過程4に記載した交配を、少なくとも合計5回繰り返して、その遺伝的背景をC57BL/6系マウスに近づけたヘテロ接合型ノックアウトマウスを得ること、及び

6) 過程5で得られたヘテロ接合型ノックアウトマウス同志を交配して、ホモ接合型又はヘテロ接合型のGLASTノックアウトマウスを得ること。

本発明の作製方法では、過程5において、過程4に記載した交配を少なくとも合計9回繰り返すことが好ましい。

本発明の作製方法により作製されたGLASTノックアウトマウスもまた、本発明に含まれ、しかも、この様にして作製されたGLASTノックアウトマウスもまた、正常眼圧緑内障のモデルマウスとして使用することができる。

【0011】

更に別の態様として、本発明は、上記の本発明のGLASTノックアウトマウス、又は上記の本発明の作製方法により作製されたのGLASTノックアウトマウスを、正常眼圧緑内障のモデルマウスとして用いる使用方法を提供する。

従って、本発明は、この様なGLASTノックアウトマウスを用いた、正常眼圧緑内障の予防及び／又は治療に有用な化合物のスクリーニング方法を提供する。特には、このスクリーニング方法は、

- 1) 本発明のGLASTノックアウトマウスに試験化合物を投与すること、
 - 2) 野生型マウスに試験化合物を投与すること、
 - 3) 上記の各マウスにおいて、投与前、及び投与してから一定期間後に、生存する視神経細胞の数量又機能を評価すること、及び
 - 4) ノックアウトマウスと野生型マウスの検査結果を比較して、試験化合物の有効性を評価すること
- を含んで成る。

本発明のスクリーニング方法では、生存する視神経細胞数又は視神経細胞機能を評価するために、網膜神経節の神経細胞数の計数に加え、網膜電位や視覚誘発電位の測定(Porciatti et al., Vision Res. 39, 3071-3081, 1999)、Visual Cl

iffテストなどの行動学的解析(Ma, L. et al., Neuron 36, 623-634, 2002)を併用して評価することが好ましい。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明において、マウスのグルタミン酸トランスポーターGLAST (Glutamate/Aspartate Transporter)とは、配列番号1に示す塩基配列を有するDNA鎖によってコードされ、配列番号2に示すアミノ酸配列を有する蛋白質のことである(非特許文献3(Tanaka, K., Neurosci. Lett. 159, 1803-186, 1993))。この蛋白質は、ラットではGluT-1とも呼ばれており(Tanaka, K., Neurosci. Res. 16, 149-153, 1993; Storck, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10955-10959, 1992)、両者はいわゆるカウンターパートである。

マウスGLASTの遺伝子(ゲノム)構造は既に解明されており、その詳細は非特許文献5(Hagiwara, T., et al., Genomics 33, 508-515, 1996)に記載されている。この遺伝子構造の概略を表1及び図1に示す。

ただし、マウスの系統によっては、マウスGLASTは、上記のコード核酸配列及びアミノ酸配列、更にはそのゲノム配列が、その機能が維持される範囲内で変異していること、例えば塩基やアミノ酸残基の置換、欠失、付加、又は挿入を受けていることもあり、本発明では、その様な変異体、例えば上記のコード核酸配列において、例えば1～10個の塩基が置換、欠失、付加、又は挿入している変異体、あるいは上記アミノ酸配列において、例えば1～10個のアミノ酸が置換、欠失、付加、又は挿入している変異体なども、マウスGLASTに含む。

【0013】

表1: マウスGLAST遺伝子のエキソン-イントロン構成

表1は、GLAST遺伝子のエキソンとイントロンの接合部位の配列を示す。エキソンの核酸配列は大文字で、イントロンの核酸配列は小文字で示している。

【表 1】

表 1: マウス GLAST 遺伝子のエキソン-イントロン構成

エキソン			イントロン			エキソン		
番号	サイズ (bp)	配列	供与部位	番号	サイズ (bp)	受容部位	配列	番号
1	64, 128, 503	TCAGAAAAG	gtatggcgca	1	~1,500	ccgtctctag	TTGTGCTCT	2
2	278	TCATTGTGC	gtgagtcgt	2	~17,700	tccccctcag	GTACAAATCC	3
3	138	a111oValG	gtacgggac	3	>13,000	cttccccag	lythrllel	4
4	205	TCGTACACG	gtatgtcct	4	~4,800	tctttgcaag	GAATGCGCG	5
5	43	cuValthrG	gtatgtcct	5	~3,100	atttttaag	lyMetAlaA	6
6	293	TTTAAACAG	gtatgtgtt	6	~2,700	ttgcccag	GAACATGTT	7
7	234	PlouilleAr	gtatgtgtt	7	496	tgccctcag	GAAGMetPh	8
8	195	TTTAAACAG	gtacagggg	8	~3,300	tgcaacag	TTTAAACCC	9
9	135	Phelys0Ln	gtgagtatt	9	~2,900	caactgcag	PhelysThr	10
10	2414	GATAATGTG					GTATGCGCC	
		lilohattfr					pTyrAlaPr	
		CTCTCCAG					TTCTGCCAC	
		rSerSerSe					rSerAlaTh	
		AACTATTAAG					CATCACAGC	
		eThrIleSe					rIleThrAl	
		CTGGTTTCT					CGACCCGCT	
		pTyrPheLe					uAmphArgLe	
		TACATTAAG						

【0014】

本発明において、グルタミン酸トランスポーターGLAST遺伝子の機能の欠損とは、相同染色体上の1又は2つのGLAST遺伝子座に存在する1又は2つの内在性GLAST遺伝子領域において、その構造をコードする領域中、例えばエキソン中に、変異を導入することにより、あるいはGLAST遺伝子の発現に関与する領域中、例えば、プロモーター領域やイントロン領域中に、変異を導入することにより、機能的なGLASTが発現しないようにすること、あるいはGLAST遺伝子の発現が恒常的に抑制されていることを意味している。いずれの場合にしろ、内在性の1又は2つのGLAST遺伝子が生体内で実質的に機能していない状態を指す。従って、本発明において、GLASTノックアウトマウスは、2つの内在性GLAST遺伝子の機能が欠損しているホモ接合型及び1つの内在性GLAST遺伝子の機能が欠損しているヘテロ接合型を包含するが、該遺伝子の機能欠損の効果の点からホモ接合型マウスが好ましい。

このような遺伝子の機能の欠損を、公知のノックアウトマウスの作製方法、例えばジーンターゲティング法により達成することができる。また、上記の変異の導入は、GLAST遺伝子領域内の塩基の置換、塩基の欠損、又はその領域内への塩基の挿入であってもよい。

【0015】

本発明において、「遺伝的背景が同一又は実質的に同一」とは、比較するマウス間において、注目する遺伝子型（GLAST遺伝子型）以外の全ての遺伝子型が99%以上同一であることを意味する。具体的には、実施例において、F1のGLAST

ヘテロ接合型ノックアウトマウスを9世代以上正常C57BL/6系マウスと戻し交配し、129系統由来の遺伝子が全遺伝子の1%以下になったことを意味する。

【0016】

1. 本発明のGLASTノックアウトマウス

本発明は、相同染色体上の1又は2つの内在性GLAST遺伝子の機能が欠損した、正常眼圧緑内障モデルマウスとしてのGLASTノックアウトマウスを提供し、具体的には、1) その眼圧が正常範囲にあり、かつ2) その網膜神経節の細胞数が、野生型正常マウスに比べて減少している、GLASTノックアウトマウスを提供する。特に、その遺伝的背景がC57BL/6系マウス、例えばC57BL/6J系マウスと同一又は実質的に同一であるものが好ましい。

野生型正常マウスの眼圧は、通常、10～21 mmHgであるが、本発明のノックアウトマウスでもまた、その眼圧は正常範囲内にある。ただし、個体により、上記範囲を逸脱することもあるが、高眼圧といわれる範囲、例えば30 mmHg以上にまで達するものではない。マウスの眼圧は、例えば電子眼圧計を用いて、測定することができる。

また、本発明のノックアウトマウスでは、その網膜神経節の神経細胞数が、正常マウスに比べて、少なくとも20%、より好ましくは少なくとも50%ほど減少している。網膜神経節の神経細胞数の減少は、慣用的な組織化学的な手法により、例えば切片を用いたヘマトキシリン/エオシン染色により、顕微鏡下に測定することができる。

更に、本発明のノックアウトマウスでは、野生型正常マウスに比べて、光刺激による網膜の電位変化の一種であるb波の低下も認められている。b波はGLASTが存在するミュラー細胞を含む網膜内層の活動電位を反映するものであり、GLASTによるグルタミン酸濃度調節機構が、視覚伝達においても重要な役割を持つことを示唆する（非特許文献1（Harada, T., et al. Proc Natl Acad Sci USA 95, 4663-4666, 1998））。

【0017】

この網膜神経節の神経細胞数の減少は、神経変性又は神経細胞死ととらえることができる。一般に、正常眼圧緑内障を含む緑内障では、視神経乳頭部の萎縮や

網膜神経繊維の欠損が認められており、現在では眼圧依存性にせよ非依存性にせよ緑内障の最終病像は、網膜神経節細胞死であると考えられている。

従って、本発明のGLASTノックアウトマウスは、その眼の性状、すなわち眼圧が正常範囲にあること、及び網膜神経節の細胞数が減少していることを考慮すると、正常眼圧緑内障のモデルマウスとして使用することができる。

【0018】

2. 本発明のGLASTノックアウトマウスの作製

第2の態様として、本発明は、本発明のGLASTノックアウトマウスの作製方法を提供する。この方法は、下記過程1～6を含んで成る：

- 1) 相同染色体上の1つの内在性GLAST遺伝子の機能を欠損させた任意のマウスES細胞を得ること、
- 2) 過程1で得られたES細胞を用いて、該細胞を含んで成るキメラマウスを得ること、
- 3) 過程2で得られたキメラマウスを、野生型C57BL/6系マウスと交配して、ヘテロ接合型ノックアウトマウスを得ること、
- 4) 過程3で得られたヘテロ接合型ノックアウトマウスを野生型C57BL/6系マウスと交配して、次世代のヘテロ接合型ノックアウトマウスを得ること、
- 5) 過程4に記載した交配を、少なくとも合計5回繰り返して、その遺伝的背景をC57BL/6系マウスに近づけたヘテロ接合型ノックアウトマウスを得ること、及び
- 6) 過程5で得られたヘテロ接合型ノックアウトマウス同志を交配して、ホモ接合型又はヘテロ接合型GLASTノックアウトマウスを得ること。

上記過程5において、交配を少なくとも合計9回繰り返すことが好ましい。

【0019】

正常眼圧緑内障モデルとして使用することができる本発明のGLASTノックアウトマウスを作製するために、基本的には、公知のノックアウトマウス作製方法、例えばジーンターゲティング法やジーントラップ法を用いることができる。基本的なノックアウトマウスの作製方法は、GLAST遺伝子の破壊を達成することができ、生存・繁殖の能力を消失していないマウスが得られるものである限り、特に

制限はない。ノックアウトマウスの作製方法に関しては、例えば、村松正實、山本雅編集、『実験医学別冊 新訂 遺伝子工学ハンドブック 改訂第3版』（1999年、羊土社発行）や八木健編集、『実験医学別冊 ザ・プロトコールシリーズ ジーンターゲティングノ最新技術』（2000年、羊土社発行）を参照することができ、適宜、この発明の実施に応用することができる。

従って、まず、慣用的な方法により、例えばジーンターゲティング法に従って、上記過程1～4を行うことができる。これらの過程は、本発明者らの研究グループによる特開平10-33087（特許文献1）及びWatase, K. et al, Eur. J. Neurosci. 10, 976-988, 1998（非特許文献4）にも開示されている。

【0020】

従来、上記過程4で得られたヘテロ接合型GLASTノックアウトマウスの雌雄を交配して得られたホモ接合型又はヘテロ接合型GLASTノックアウトマウスが既に開示されているが、このタイプのGLASTノックアウトマウスでは、野生型正常マウスと比べて、網膜神経節の細胞数に実質的な変化は認められなかった。ただし、該GLASTノックアウトの眼に対して生理食塩水を150 cm H₂Oの圧力で60分間注入することより、網膜を一過的な虚血状態にした後にのみ、網膜神経節の細胞数の減少が観察されていた（非特許文献1（Harada, T., et al. Proc Natl Acad Sci USA 95, 4663-4666, 1998））。

この様なことから、この様な従来のGLASTノックアウトマウスを、正常眼圧緑内障のモデルとして用いることはできない。

本発明の作製方法に従って、この様な従来のGLASTノックアウトマウスを更に改良することにより、先に示した正常眼圧緑内障たる本発明のGLASTノックアウトマウスを作製することができる。

【0021】

以下に、標準的なノックアウトマウス作製方法であるジーンターゲティング法を例として、本発明のノックアウトマウスの作製方法を説明する。

過程1

(1) ターゲティングベクターの作製。

ジーンターゲティング法では、マウスES細胞内の染色体上のGLAST遺伝子座を

破壊するために、ターゲティングベクターを用いて、該遺伝子座に変異を導入する。

GLAST遺伝子の機能を欠損させるためには、GLAST遺伝子のいずれかの部分に、例えば1又は複数のエキソン部分に、塩基の欠失を生じさせ、点変異を導入し、又は他の遺伝子を挿入することができる。通常、内在性GLAST遺伝子が破壊されたES細胞をより容易に選択するために、選択マーカー遺伝子を挿入することが好ましい。

そのような遺伝子として、ポジティブ選別に用いるマーカー遺伝子、例えばネオマイシン (neo) 耐性遺伝子を用いる。このネオマイシン耐性遺伝子は、ネオマイシン類似体であるG418を用いることにより目的遺伝子の選別を可能にする。また、目的遺伝子を選別除去するためにネガティブ選別に用いるマーカー遺伝子を用いることもできる。このような遺伝子としては、例えば、チミジンキナーゼ (tk) 遺伝子 (選別剤としてガンシクロビル、FIAU等を用い、それに対する感受性により非相同組換え体を選別除去する)、ジフテリアトキシンAフラグメント (DT-A) 遺伝子 (DT-Aにより発現されたジフテリア毒素により、非相同組換え体を選別除去する) が用いられる。あるいは、ポジティブ/ネガティブ選別を行うために、これらの組み合わせを用いることもできる。例えば、ネオマイシン耐性遺伝子及びジフテリアトキシンAフラグメント遺伝子(Yagi, Nada, Watanabe et al., Analytical Biochemistry 214, 77-86, 1993)、あるいはネオマイシン耐性遺伝子及びチミジンキナーゼ遺伝子(Mansour, Thomas, Capacchi, Nature 336, 348-352, 1988)を挿入することが好ましい。

【0022】

該遺伝子配列中、変異を導入する部分、例えば上記マーカー遺伝子を挿入する部分は、該遺伝子の機能が欠損する部位であれば特に限定されないが、通常エキソン部分である。

GLAST遺伝子のゲノム構造 (制限酵素地図及び各エキソン-イントロン連結点) が既に知られており (非特許文献5 (Hagiwara, T., et al., Genomics 33, 508-515, 1996))、その構造の概略を図1及び表1に示す。マウスGLAST遺伝子は10個のエキソンを含み、いずれかのエキソンに、該遺伝子の欠損が生じるよう

にマーカー遺伝子を挿入することが好ましい。

【0023】

上記の通りに該遺伝子の機能を破壊するために、標的遺伝子との相同組換が可能であり、その結果、標的遺伝子に変異を導入することができるターゲティングベクター（相同組換え用DNA）を、GLASTをコードする核酸配列（配列番号1）及びGLAST遺伝子のゲノム配列の情報（非特許文献5）を基にして、常用のDNA組換え技術、例えばPCR法や部位特異的変異導入法により、作製することができる。

例えば、該遺伝子の全部又はその断片を含むDNA分子を、使用するES細胞の基となった系統のマウスから慣用的な方法によって単離する。該DNA分子は、GLAST遺伝子の全長、若しくは全長とともに該遺伝子の5'上流域及び／又は3'下流域をさらに含むDNA分子であってもよい。

次に、得られたDNA分子から、該遺伝子中、変異を導入する部位に相当する部分に、所望の変異を導入した、例えば、上記のマーカー遺伝子を導入した改変DNA分子を調製する。塩基配列の改変は、PCRにより増幅したDNA分子の連結や、部位特異的変異など慣用の組換えDNA技術によればよい。このようなターゲティングベクターを構築する際に、ターゲティングベクター構築用として市販されているプラスミドベクターを利用してもよい。

【0024】

(2) ターゲティングベクターのES細胞への導入、及び内在性GLAST遺伝子との相同組換。

こうして得られたターゲティングベクターを、マウス胚性幹細胞（ES細胞）に導入し、ES細胞中のGLAST遺伝子との間で相同組換えを行わせる。ターゲティングベクターのES細胞への導入は、例えばエレクトロポレーション法やリポフェクション法等の、慣用のDNA導入法により行うことができる。ターゲティングベクターが導入された細胞内では、その染色体上のGLAST遺伝子とターゲティングベクター上の対応部分との間で相同組換えが生じ、その内在性遺伝子内に、ターゲティングベクター中の改変された塩基配列、例えばマーカー遺伝子が挿入される。その結果、ES細胞は内在性GLAST遺伝子の機能を欠損し、例えば同

時にマーカー遺伝子を含むことになる。ターゲティングベクター導入後の細胞を、例えばマーカー遺伝子の選別機能により、あるいは相同的組換えを確認するサザンブロッティング法、PCR法等の常法によりスクリーニングすることにより、GLAST遺伝子機能を欠損したES細胞（以下、組換えES細胞と称す）を得ることができる。なお一般的には、この様な相同組換えにより相同染色体の一方のみのGLAST遺伝子が破壊されたES細胞が得られる。

使用するマウスES細胞としては、一般的には既に樹立されている129系のES細胞が用いられる。その他、C57BL/6系やBDF1系（C57BL/6系とDBA/2系との交配によるF1）マウスを用いて、公知の方法(Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (Robertson, E.J. ed.), IRL press, Oxford, 1987)に従って樹立したES細胞を用いることもできる。好ましくは、129系のES細胞が用いられる。

【0025】

過程2. 3

F1世代のヘテロ接合型GLAST遺伝子ノックアウトマウスの作製

次に、得られた組換えES細胞を発生させてキメラマウスを得る。そのために、組換えES細胞を、マイクロインジェクション法や凝集法により、胚盤胞期又は8細胞期等の正常なマウス胚に注入し、その様にして得られたキメラ胚を、擬妊娠状態にある雌性マウスの子宮角に移植し、この移植マウスを通常通り飼育して、キメラマウス仔を出産させることができる。好ましくは、組換えES細胞を、C57BL/6系マウスの胚に注入することが好ましい。

このキメラマウスは、通常、その体細胞及び生殖細胞として、組換えES細胞由来の細胞と正常細胞とを含んでなり、これを適当な系統の野生型マウス、好ましくはC57BL/6系マウス、例えばC57BL/6J系マウスと交配することによりヘテロ接合型のF1産仔が得られる。通常、雄性キメラマウスと雌性野生型マウスとを交配して、F1世代のヘテロ接合型マウスを産出させる。交配に用いたキメラマウスの生殖細胞が、上記の組換えES細胞、すなわち相同染色体の一方に存在する内在性GLAST遺伝子が破壊されているES細胞に由来していれば、該遺伝子の機能が欠損した所望のヘテロ接合型F1マウスを得ることができる。

上記行程において、ヘテロ接合型 F1 マウスを高効率に得るために、例えば、キメラ胚を作製する際に、組換え ES 細胞の起源マウスとは異なる体毛色のマウスに由来する正常宿主胚細胞を組み合わせれば、体毛色を観察することにより、生体における組換え ES 細胞の占める割合の高いキメラマウスやヘテロ接合型 F1 マウスの選択が容易となる。

F1 世代において所期の遺伝子型が達成されているか否かは、その尾から抽出した DNA に対して、サザンブロット法や PCR 法により分析を行うことにより、確認することができる。

【0026】

過程 4, 5, 6

(1) 本発明の GLAST 遺伝子ノックアウトマウスの獲得

本発明では、GLAST 遺伝子ノックアウトマウスの遺伝的背景を、できるだけ C57BL/6 系マウスに近づけることが好ましい。そのために、上記の通りに作製した F1 ヘテロ接合型マウスを更に C57BL/6 系マウス、例えば C57BL/6 J 系マウスと交配し、生まれてきたヘテロ接合型マウスを、再度 C57BL/6 系野生型マウスと交配するという作業を繰り返す。この作業を、通常合計少なくとも 5 回、好ましくは少なくとも 9 回、より好ましくは少なくとも 15 回行う。最後に、得られたヘテロ接合型マウスの雌雄を交配して、GLAST 遺伝子の機能を欠損した、本発明のホモ接合型又はヘテロ接合型ノックアウトマウスを得ることができる。グルタミン酸トランスポーター遺伝子の機能欠損の効果の点からホモ接合型マウスが好ましい。

各世代において所期の遺伝子型が達成されているか否かは、上記と同様にサザンブロッティング法、PCR 法、塩基配列決定等の常法によればよい。

この様に作製することができる本発明のノックアウトマウスを、雄性・雌性の組合わせとして一旦得ておけば、それ以降は、必要に応じて適宜繁殖させることにより、容易に同じ遺伝子型のノックアウトマウスを必要数得ることができる。

【0027】

(2) 本発明の GLAST ノックアウトマウスの網膜及び眼圧の解析

最後に、上記の通りに作製したホモ接合型又はヘテロ接合型 GLAST ノックアウ

トマウスにおいて、その眼圧が正常範囲にあること、及び網膜神経節の神経細胞が減少していることを確認する。この様な眼の性状が確認できない場合には、過程 5 に記載の交配を更に繰り返すことによって、上記性状を満たす本発明のノックアウトマウスを得ることができる。

本発明のGLASTノックアウトマウスの眼圧は、通常約 21 mmHg以下、例えば約 10 ~ 21 mmHgである。用いたES細胞の起源であるマウスの系統、又はキメラ胚の作製に用いた正常胚の起源であるマウスの系統によって、この眼圧範囲は多少変動しうるが、それを考慮しても 30 mmHg以下でなければならない。

本発明のGLASTノックアウトマウスでは、その網膜神経節の神経細胞数が、野生型マウスに比べて、少なくとも 20%、より好ましくは少なくとも 50%ほど減少している。

以下に、網膜神経節細胞数の計測方法と眼圧の測定方法の例を説明するが、これらの方法に限らず、公知の慣用的な方法を用いてよい。例えば、非特許文献 1 (Harada, T., et al. Proc Natl Acad Sci USA 95:4663-4666, 1998)や非特許文献 2 (Harada, C. et al., Neurosci. Lett. 292, 134-136, 2000)を参照されたい。

これらの測定では、上記の本発明のホモ接合型又はヘテロ接合型ノックアウトマウスに対する対照マウスとして、それらのマウスを得る際に同時に出生した野生型正常マウス、あるいは単に正常（野生型）C57BL/6系マウスを用いる。

必要に応じて、上記の対照マウスの他に、上記の F1 ヘテロ接合型ノックアウトマウス若しくはその雌雄を交配することにより得られるホモ接合型又はヘテロ接合型GLASTノックアウトマウス、又は戻し交配の途中で得られるヘテロ接合型ノックアウトマウスなどにおいても、上記の測定を行う。

【0028】

網膜神経節細胞数の計測：

マウスの網膜神経節細胞数を、通常の組織化学的な手法により、又は逆行性ラベリング法により測定することができる。

(a) 病理切片を用いた方法

1) 試験対象マウスを、麻酔により鎮静させ、4%パラホルムアルデヒド/P

BS溶液にて灌流固定する。

2) 眼球を取り出して4℃の同液中で更に2時間固定する。

3) 眼球をパラフィンに包埋した後、切片、例えば厚さ7 μ mの切片を作製する。

4) ヘマトキシリン/エオシン染色を行い、顕微鏡下に、視神経を含む断面で神経節細胞数をカウントする。

【0029】

(b) 逆行性ラベリングを用いた方法

1) 麻酔により鎮静したマウスの頭部を固定する。

2) 顕微鏡下で、エタノール噴霧した後、頭部をハサミで横切開し、頭蓋骨を露出させる。

3) 縫合線と血管を確認後、グラインダーで手術用の穴をあけ、そこからマイクロシリンジで上丘実質に、例えば蛍光色素Fluoro-Gold (一般名aminostilbamidine; Molecular Probes社) やカルボシアニン蛍光色素、例えばDiI (一般名1,10-dioctadecyl-3,3',3'',3'''-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes社) を注入する。

4) 皮膚をクリップで綴じた後、覚醒薬を腹腔内に注射して、回復を確認する。

5) 手術後7日間通常通り飼育した後、処置マウスをエーテル麻酔にて死亡させ、眼球を取り出し、前眼部を除去する。

6) 網膜を含む後眼部を4%パラホルムアルデヒド溶液に入れ、4℃で20分間固定する。

7) 網膜を取り出して伸展標本を作成する。

8) 蛍光顕微鏡にて写真撮影後、蛍光ラベルされた網膜神経節細胞数をカウントする。

マウスの麻酔は、通常の動物実験に使用される麻酔剤であれば、マウスを死亡させない濃度範囲で、いずれのものを用いてもよい。例えばケタミン(10 mg/ml)/メドミジン(1 mg/ml)の1:1混合液(0.15-0.2 ml/マウス)を用いてよく、この場合アチパメゾール(5 mg/ml)(0.15-0.2 ml/マウス)により覚醒させる

ことができる。

【0030】

眼圧の測定：

- 1) 上記と同様に、通常の麻酔によりマウスを鎮静させる。
- 2) 鎮静したマウスの眼圧を、電子眼圧計（例えばトノペンXL、米国メドトロニック・ソーラン社製）を用いて測定する。

【0031】

視覚機能又は視神経細胞の機能を評価するためには、網膜電図(Electricretinograms, ERG)を測定してもよい。これは、光刺激により網膜から得られる電氣的反応を測定するものであり、生体における視神経細胞の神経伝達の活動度を表す、よい指標である。詳しくは、「現代の眼科学 改訂第8版」（所敬、金井淳編集、金原出版発行）や「視能矯正学 改訂第2版」（丸尾敏夫編集、金原出版発行）、又は非特許文献1 (Harada, T., et al. Proc Natl Acad Sci USA 95:4663-4666, 1998)を参照されたい。

以下に、その測定方法を簡単に説明する。

- 1) マウスを常法により麻酔した後、頭部ホルダーを用いてマウスの位置を固定する。
- 2) 0.5 %フェニレフリン及び0.5 %トロピカミドを投与して、瞳孔を拡張させる。
- 3) 炭素繊維電極を角膜表面に接触させ、基準電極を前頭皮下に接触させる。
- 4) 30分間暗順応させる。
- 5) 光刺激装置(SLS-3100, Nihon Kodan, Japan)により、0.6又は1.2 Jの強度で、10 μ 秒間の閃光を与えて、網膜を刺激する。
- 6) 得られた電位を、増幅器(MEB-5304, Nihon Kodan)により、周波数の帯域を50-1000 Hz及び1-1000 Hz（各々振動電位OP及びa波又はb波を測定する場合）に設定して、増幅する。
- 7) 2回の応答電位を、平均化して記録する。
- 8) データとして、a波、b波、及び各種振動電位を解析する。

【0032】

3. 正常眼圧緑内障の予防及び／又は治療に有用な化合物のスクリーニング方法

本発明のノックアウトマウスは、正常眼圧緑内障を予防及び／又は治療するために有効な化合物、特に網膜神経節の神経細胞を含む、視神経細胞の死もしくは変性、又はその機能の低下を抑制するために有効な化合物、あるいは視神経細胞又はその機能を回復させるために有効な化合物をスクリーニングするために用いることができる。

従って、本発明は、正常眼圧緑内障の予防及び／又は治療に有用な化合物のスクリーニング方法であって、

- 1) 本発明のホモ接合型又はヘテロ接合型GLASTノックアウトマウスに試験化合物を投与すること、
 - 2) 野生型正常マウスに試験化合物を投与すること、
 - 3) 上記の各マウスにおいて、投与前、及び投与してから一定期間後、生存する視神経細胞の数量又機能を評価すること、及び
 - 4) GLASTノックアウトマウスと野生型マウスの検査結果を比較して、試験化合物の有効性を評価すること
- を含んで成るスクリーニング方法を提供する。

【0033】

試験化合物が、正常眼圧緑内障の予防及び／又は治療にとって有効であるか否かは、緑内障に特徴的な徴候を改善できるか否かを検査することによって判定することができる。例えば、網膜神経節の神経細胞数を計数することにより、試験化合物の投与により、対照マウスに比べて、その数が少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%回復していれば、その試験化合物は、医薬上有効であると判定してよい。また、網膜電位を測定することにより、試験化合物の投与により、対照値に比べて、例えばb波や振動電位の大きさが、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%回復していれば、その試験化合物は、医薬上有効であると判定してよい。

【0034】

本発明のヘテロ接合型ノックアウトマウスは、出生後、週齢と共に網膜神経節

の細胞数が徐々に低下していくことが判明している（図4）。従って、上記スクリーニング方法の1つの態様として、1）出生後直ぐに、1群のヘテロ接合型ノックアウトマウスには定期的に試験化合物を投与し、もう1群のヘテロ接合型ノックアウトマウスには試験化合物を投与せず、2）各週齢で、網膜神経節の細胞数を測定し、そして3）両者の比較から、網膜神経節の細胞数の経時的な低下を抑制する化合物を選別することもできる。

【0035】

試験化合物としては、天然及び合成化合物の他、動植物の抽出物、発酵生成物、ペプチド、蛋白質、又は核酸分子など、任意の物質を用いることができる。所望の蛋白質を発現するための遺伝子ベクターであってもよい。試験化合物の投与経路も、試験化合物の性質が許す限り、種々の方法を試みてよく、例えば点眼や経口投与によることもできる。投与期間や投与様式も、試験化合物の効果を最大限にする様に選択される。この様な試験化合物の種類や投与方法は、製薬分野又は医学分野における通常の方法に従ってもよい。

【0036】

更に、本発明のGLASTノックアウトマウスを、他の種類のノックアウトマウス又は他の種類の疾患モデルマウスと交配して、新たな疾患モデルマウスを作製することもできる。この様な、本発明のGLASTノックアウトマウスの使用もまた本発明に含まれる。

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明は、これに限定されるものではない。

【0037】

【実施例】

実施例 1

GLAST(GluT-1) 遺伝子機能欠損マウスの作成

(1) マウスGLAST(GluT-1) 遺伝子DNAの相同組換え用DNAの作成

129SVマウスの肝から抽出したゲノムDNA(野生型マウスGLAST(GluT-1) 遺伝子)を、制限酵素S_{au}3A_Iで部分消化して得たゲノムライブラリーラムダFIXIIについて、マウスGLAST(GluT-1) 遺伝子のcDNAの部分配列をプ

ローブとして用いてハイブリダイゼーションを行い、 1×10^6 個のコロニーについて検索した結果、26個の陽性クローンを得た。これを制限酵素 *EcoRV* 及び *XhoI* で不完全消化させて、第6エクソンから第8エクソンを含む、全長 9 kbp のゲノムDNAをサブクローニングした(図2、上段)。次いで、GLAST(GluT-1)遺伝子を破壊するために、第6エクソンの *BamHI* 以降 1.5 kbp を欠損させ、そこにネオマイシン耐性遺伝子を、さらに第8エクソンの下流にジフテリアトキシンAフラグメント遺伝子を挿入した(図2、中段)。ゲノムDNAとの相同部分は、ネオマイシン耐性遺伝子上流が 2.5 kbp、ネオマイシン耐性遺伝子とジフテリアトキシンAフラグメント遺伝子との間が 5 kbp となるように構築した。得られた構築体を、pBlue-script SK に挿入し、ES細胞への導入の際に制限酵素 *NotI* で切断して線状化することによりターゲティングベクター(相同組換え用DNA: pGluT1NeoDT)を得た(図2、中断)。

【0038】

(2) 相同組換え用DNAの導入によるES細胞のGLAST(GluT-1)遺伝子の欠損

相同組換え用DNA 75 μ g をマウスES細胞(E14株) 3×10^7 個を含むエレクトロポレーション用緩衝液(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HP0₄, 1.8mM KH₂PO₄) に懸濁させ、Field Strength 210V/cm, Capacitance 500 μ F の条件で、遺伝子導入を行った。導入後24時間から250 μ g/ml の G418 (Genetisin, GIBCO BRL) で選択培養を行った。

【0039】

G418耐性コロニーを、遺伝子導入後192時間後から、マイクロピペットを用いて60 μ l の Tris-EDTA 溶液(10mM Tris-HCl pH 8.0 と 1mM EDTA pH 8.0 とからなる溶液)を含む96穴のマイクロプレート(FALCON 3077)に移し換え、数分間処理した後、ピペッティングすることによって単一細胞にし、これらを24穴のマイクロプレート(FALCON 3047)に移し換え、培養を継続した。採取したコロニーは、その長径がマイクロチップの内径の1/2以上に達したもので、この時の細胞数は

、 $1 \times 10^4 \sim 10^5$ 個であった。エレクトロポレーション後の生存細胞数は、 6.0×10^7 個であった。G418耐性コロニー数は、 2.4×10^2 個で、生存細胞数の $1/2.5 \times 10^5$ であった。

【0040】

24穴のマイクロプレート上の細胞が3～4日の培養でコンフルエントに達した段階で、細胞を0.25%トリプシンで、37℃で5分間処理後、順次、35mm (FALCON 3001) 又は60mm (FALCON 3002) の組織培養用シャーレ内で培養し、細胞の増殖を行った。なお、ES細胞の培養は、すべてフィーダー細胞上で行った。相同組換え体の確認をサザンブロットによって以下の通りに行った。

【0041】

サザンブロット解析については、G418耐性細胞からゲノムDNAを抽出し、制限酵素PvuIIで消化後、第5イントロンのApaI-EcoRV断片、0.5kbをプローブとして用いて行った。破壊された対立遺伝子を含む相同組換え体(図2、下段)及び非相同組換え体の確認は、それぞれ、4.2kb及び7kbのバンドの検出によって行った。相同組換え体コロニー数は、G418耐性コロニー242個中1個(2B7)であった。

【0042】

(3) ES細胞及びその培養方法

ES細胞として、129/SvJ系マウス胚盤胞由来のE14株を用いた。ES細胞の培養には、ダルベッコウ修正イーグル培養液(DMEM, 11960-010 GIBCO)に15%牛胎児血清(FCS)、0.1mMの2-メルカプトエタノール、核酸混合液、非必須アミノ酸溶液及び 10^3 unit/mlのLIF (AMRAD) を添加したSCM培養液(Robertson, Teratocarcinomas and embryonic stem cells a practical approach 1987)を用いた。

【0043】

また、ES細胞のフィーダー細胞として用いるマウス胎児繊維芽細胞の培養には、DMEMに10%FSCを添加したものをを用いた。マウス胎児繊維芽細胞の調製及び培養は、以下の通りに行った。胎齢13～14日のICR系マウスの胎

児を無菌的に採取し、カルシウム及びマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS-) で洗浄後、ピンセットを用いて心臓、肝臓及び腸管を除き、眼科用のハサミを用いて細切した。次いで、得られた細切片を 0.25% トリプシン及び 0.04% EDTA を含む PBS- (以下 TE 溶液という) で、室温で 20 分間処理して細胞浮遊液を得た。

【0044】

細胞浮遊液を 1500 rpm、5 分間の遠心後、上清を除去し、10% FCS 加 DMEM に懸濁させて 2 分間静置した。そして、下部に沈んだ組織片を除いた細胞浮遊液を 100 x 20 mm の組織培養用シャーレ (FALCON 3003) に移し、37℃, 5% CO₂, 95% 空気の条件で培養に供した。翌日、細胞浮遊液を PBS- で 1 回洗浄し、培養を継続した。継代は、3~4 日間隔で行い、継代が三代目までの細胞をフィーダー細胞として使用するためにマイトマイシン処理を施した。

【0045】

コンフルエント状態にまで増殖したマウス胎児繊維芽細胞を 2 mg/ml のマイトマイシン C 75 μ l で 3~4 時間処理し、PBS- で 3 回洗浄後、TE 溶液で室温で 3 分間処理して細胞を剥離した。次いで、遠心後、細胞数を 5 x 10⁵ /ml に調整し、60 x 10 mm のゼラチンコートディッシュ (FALCON 3002) に 3 ml ずつ分注した。以上のように作成したフィーダー細胞は、1 週間以内に使用した。ES 細胞の継代は、室温で 5 分間 TE 溶液で処理後、ピペティングによって ES 細胞を単一細胞に分散させ、4 x 10⁵ 個の細胞をフィーダー細胞層上に播種することによって行った。

【0046】

培養液は、24 時間間隔で交換し、継代間隔は、56~64 時間とした。また、凍結保存する際には、1 x 10⁶ 個の細胞を SCM に懸濁して凍結用チューブ (2 ml, FALCON 4818) に移し、0.5 ml の凍結用培地 (20% DMSO 添加 DMEM) を滴下した後、-80℃で一晩放置し、液体窒素中で保存した。

【0047】

(4) GLAST(GluT-1)遺伝子欠損ES細胞によるキメラマウスの作成

(a) GLAST(GluT-1)遺伝子欠損ES細胞の胚盤胞への注入

ES細胞を、C57BL/6J系マウスの胚盤胞に注入した後、得られた宿主胚を偽妊娠マウスの子宮角に移植して産仔を得た。宿主胚の採取は、自然交配4日目、Hepes-buffered-Whitten's培地で、子宮を灌流することによって行った。注入に用いたES細胞は、継代2日目又は3日目にTE溶液で処理を行った後、ゼラチンコートディッシュに30分間静置することによって、フィーダー細胞を除去し、顕微操作に供するまで、氷上に静置した。

【0048】

ES細胞の注入用ピペットは、外径1mmの微小ガラス管(NARISHIGE)を微小電極作製器(NARISHIGE, PN-3)を用いて細かく引き延ばし、研磨器(NARISHIGE)で、内径が約20 μ mとなるように先端を研磨し、さらにマイクロフォージ(DeFonbun)で先端を鋭利に加工した。胚保定用ピペットは、上述の方法で引き延ばしたガラス管をマイクロフォージを用いて、外径50~100 μ mの部分で切断した後、さらに口径を10~20 μ mに加工して用いた。

【0049】

注入用ピペットと保定用ピペットは、先端から約5mmの部分を実約30度曲げて、マイクロマニピュレーター(LEITZ)に接続した。顕微操作に用いたチャンバーは、穴あきスライドグラスにカバーグラスを密蝟で接着させたものを用い、その上に約20 μ lの5%FCS添加Hepes-buffered-Whitten's培地のドロップを2個置き、その上面をミネラルオイル(M8410, Sigma)で覆った。一方のドロップには、約100個のES細胞を入れ、他方には、拡張胚盤胞を10~15個入れ、胚1個あたり10~15個のES細胞を注入した。

【0050】

顕微操作はすべて、倒立顕微鏡下で行った。操作胚は、1~2時間の培養後、偽妊娠2日目のICR系受容雌の子宮角に移植した。分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し、里親に哺育させた。自然

交配4日目に、子宮を灌流することによって採取したC57BL/6J系マウスの胚盤胞160個にES細胞2B7を注入した結果、123個が生存し、成功率は77%であった。123個を偽妊娠2日目のICR系受容雌の子宮角に移植した結果、103個に着床が認められ、95匹の産仔が得られた。離乳に至った83匹の産仔のうち、毛色でキメラマウスと判定できたのは30匹で、このうち26匹が、形態的に雄を示していた。これらのキメラマウスにおけるES細胞の寄与率は、10～95%の幅であり、寄与率が60%未満が10例、60%以上90%未満が14例、90%以上が2例であった。

【0051】

(b)得られたキメラマウスを、C57BL/6J系マウスと交配し、娩出される産仔(F1ヘテロ型マウス)がGLAST(GluT-1)遺伝子欠損ES細胞由来であるか否かを検定した。キメラマウスの生殖細胞がES細胞に由来していれば、娩出される産仔の毛色は野生色を呈し、C57BL/6J系マウスの胚盤胞に由来していれば黒色を呈する。ES細胞の寄与率の高い(70%以上)9例(No. 1, 5, 13, 20, 33, 41, 54, 62, 81)のキメラマウスのうち、現在までに8例(No. 1, 5, 20, 33, 41, 54, 62, 81)について、ES細胞の生殖系列への伝達が確認された。

【0052】

No. 5とC57BL/6J系雌マウスとの交配では、3回の分娩で合計23匹の産仔が得られ、このうち、23匹が野生色の毛色を示していた。また、No. 33とC57BL/6J系雌マウスとの交配で得られた15匹の産仔のうち、12匹が野生色の毛色を示した。これらの野生色マウスのうち23例についてサザンブロットによる解析を行った結果、11例でGLAST(GluT-1)遺伝子の欠損を確認した。

【0053】

(5) C57BL/6J系マウスとの戻し交配

GLAST遺伝子の欠損が確認されたF1ヘテロ型雄マウスを、C57BL/6J系野生型雌マウスと交配させ、産仔を得た。その遺伝型をサザンブロットにより解析し、GLAST遺伝子の欠損が確認された次世代のヘテロ型雄マウスを選別した。再び、このヘテロ型雄マウスをC57BL/6J系雌マウスと交配をさせ、更に次の世代のへ

テロ型雄マウスを得た。この様にして、次々と同様の交配を合計 9 回繰り返し、世代を更新したGLAST遺伝子欠損ヘテロ型マウスの雌雄を得た。最終的に、このヘテロ型マウスの雌雄を交配することによって、GLAST遺伝子欠損についてホモ型のGLASTノックアウトマウス (GLAST^{-/-})、GLAST遺伝子欠損についてヘテロ型のGLASTノックアウトマウス (GLAST^{+/-})、及び野生型のマウス (GLAST^{+/+})を得た。これらのマウスを以下の測定に用いた。

【0054】

実施例 2

眼圧の測定

実施例 1 で得られたホモ接合型GLASTノックアウトマウス及び野生型正常マウスにおいて、生後 1 年の時点で、眼圧を測定した。各群 4 匹ずつを麻酔により鎮静させた後に、その眼圧を電子眼圧計により測定した。その結果、以下に示す。

野生型正常マウス: 19 ± 4 mmHg

ホモ型ノックアウトマウス: 15 ± 3 mmHg (平均値±標準偏差)

この結果から、ホモ型GLASTノックアウトマウスの眼圧は、正常範囲にあることが確認された。

【0055】

実施例 3

網膜神経節細胞数の計測

種々の週齢で、実施例 1 で得られたホモ接合型GLASTノックアウトマウス、ヘテロ接合型GLASTノックアウトマウス、及び野生型正常マウスにおいて、網膜切片のヘマトキシリン／エオシン染色、及びFluoro-GoldまたはDiIによる網膜神経細胞の逆行性ラベリングにより、各マウスの網膜神経節の細胞数を測定した。

【0056】

切片の染色による観察:

1) 試験マウスを、ケタミン (10 mg/ml) / メデトミジン (1 mg/ml) の 1 : 1 混合液 (0.15-0.2 ml/マウス) により鎮静させ、4 %パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定し、

2) 眼球を取り出して 4 °C の同液中で更に 2 時間固定し、

3) 眼球をパラフィンに包埋した後、切片、例えば厚さ $7\ \mu\text{m}$ の切片を作製し、そして

4) ヘマトキシリン/エオシン染色を行い、顕微鏡下に、網膜神経節領域の神経細胞を観察した。この顕微鏡像を図 3 に示す。

5) 各マウス毎に、網膜神経節部分を含む切片中の神経細胞数を計測した。その結果を図 4 に示す。

【0057】

逆行性ラベリングによる観察：

1) ケタミン($10\ \text{mg/ml}$)/メドミジン($1\ \text{mg/ml}$)の 1 : 1 混合液 ($0.15\text{--}0.2\ \text{ml/マウス}$) により鎮静させた後、マウスの頭部を固定し、

2) 顕微鏡下で、エタノール噴霧した後、頭部をハサミで横切開し、頭蓋骨を露出させ、

3) 縫合線と血管を確認後、グラインダーで手術用の穴をあけ、そこからマイクロシリンジで上丘実質にFluoro-GoldまたはDiIを注入し、

4) 皮膚をクリップで綴じた後、アチパメゾール($5\ \text{mg/ml}$) ($0.15\text{--}0.2\ \text{ml/マウス}$) を腹腔内に注射して、回復を確認した。

5) 手術後 7 日間通常通り飼育した後、処置マウスをエーテル麻酔にて死亡させ、眼球を取り出し、前眼部を除去し、

6) 網膜を含む後眼部を 4 % パラホルムアルデヒド溶液に入れ、 $4\ ^\circ\text{C}$ で 20 分間固定し、

7) 網膜を取り出して進展標本を作成し、そして

8) 蛍光顕微鏡にて、蛍光ラベルされた網膜神経節細胞の像を、写真撮影した。この像を図 5 に示す。

【0058】

これらの結果 (図 3 ~ 5) から、ホモ型 GLAST ノックアウトマウスでは、その網膜神経節の神経細胞数が、野生型マウス及びヘテロ型ノックアウトマウスに比べて、有意に低下していることが判明した。ヘマトキシリン/エオシン染色の結果 (図 3)、矢印で示す網膜神経節細胞数が減少している。また中央に位置する内顆粒層における細胞数 (アマクリン細胞、双極細胞など) の減少と、それに伴

う内顆粒層のひ薄化が観察された。また、ホモ型GLASTノックアウトマウスでは、生まれた時から細胞数が低下しているが、ヘテロ型ノックアウトマウスでも、経時的に細胞数が減少し、5週齢以降では、野生型マウスに比べて有意に低下していることが判明した（図4）。

【0059】

【発明の効果】

本発明の、正常眼圧緑内障のモデルマウスとしての、内在性GLAST遺伝子が欠損したホモ型又はヘテロ型GLASTノックアウトマウスは、該疾患の治療に有効な治療薬の開発のために、その治療方法の確立のために、そしてまた該疾患の病態生理、例えば発症原因、発症メカニズム又は進行メカニズムの解明のために、極めて有益であると期待される。

【0060】

【配列表】

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> GLAST-deficient Mice

<130> P03-0032

<140>

<141>

<160> 2

<210> 1

<211> 1629

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 1

atgaccaaaa gcaacggaga agagcctagg atggggggca ggatggagag attgcagcaa 60
ggggtccgca agcggacact tctggccaag aagaaagttc agagcctcac caaggaagat 120
gttaagagtt acctgtttcg gaatgccttc gttctgctca cggtcactgc tgtcattgtg 180
ggtacaatcc ttggatttgc cctccgaccg tataaaatga gctaccggga ggtgaagtac 240
ttttcgttcc ctggggagct tctcatgagg atgctgcaga tgctggctctt gcccctgac 300
atctccagtc tcgtcacagg aatggcggcc ctagatagta aggcacccgg gaagatgggg 360
atgcgcgtg tagtctatta catgactact accatcattg ctgtggatgat tggcataatc 420
attgtcatca tcatccacc cggaaagggc acaaaggaaa acatgtacag agaaggtaaa 480
atcgtgcagg tcaactgcagc agatgccttc ctggatttga tcaggaacat gttccctccc 540
aatctggtag aagcctgctt taaacagttt aaaaccagct acgagaaaag aagctttaaa 600
gtgcctatcc agtccaacga aacacttctg ggcgccgtga tcaacaacgt gtcagaggcc 660
atggagactc tgaccgggat ccgggaggag atggtgcccg tgcctggatc tgtgaatggg 720
gtcaatgccc tgggcctagt tgtcttctcc atgtgcttcg gtttcgtgat cggaacatg 780
aaggagcagg ggcaagcgt gagagagttc tttgattctc ttaacgaagc catcatgcga 840
ttggtcgcgg tgataatgtg gtatgcgcct ctgggcatcc tcttcttgat cgcagggaag 900
attgttgaga tggaagacat ggggtgtgatt gggggacagc ttgcatgta caccgtgaca 960
gtcattgtcg gcctcctcat tcacgccgtc atcgtcctgc ctctcctcta ctctctggta 1020
acccggaaga acccctgggt tticattgga gggttgctgc aagcgctcat cacagccctt 1080
gggacctcct caagtctctgc caccctaccc atcactttca agtgccctgga agagaacaat 1140
gggtgtggaca aacgcatcac cagatttgtg ctccccgtgg gggccaccat taacatggat 1200
gggaccgccc tctacgagge tttggctgcc attttcatcg ctcaagtga caactttgac 1260
ctgaactttg gacagattat aacaataagc atcacagcca cggccgcaag catcggggca 1320
gccgggatcc ctccaggccg tctggtcacc atggatcatc tgctgacatc tgtgggcctg 1380
cccacagatg acatcacact catcattgca gtggactggg ttctggaccg cctccgaacc 1440
accaccaacg tactgggtga ctccctcgga gcagggattg tcgagcactt gtcccgacat 1500
gaactgaaga accgagatgt tgaaatgggg aactcgggtga ttgaggagaa cgaaatgaag 1560
aagccgtatc agctgattgc ccaggacaat gaaccggaga aaccctgggc agacagcgaa 1620
accaagatg 1629

<210> 2

<211> 543

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 2

Met Thr Lys Ser Asn Gly Glu Glu Pro Arg Met Gly Gly Arg Met Glu
 1 5 10 15
 Arg Leu Gln Gln Gly Val Arg Lys Arg Thr Leu Leu Ala Lys Lys Lys
 20 25 30
 Val Gln Ser Leu Thr Lys Glu Asp Val Lys Ser Tyr Leu Phe Arg Asn
 35 40 45
 Ala Phe Val Leu Leu Thr Val Thr Ala Val Ile Val Gly Thr Ile Leu
 50 55 60
 Gly Phe Ala Leu Arg Pro Tyr Lys Met Ser Tyr Arg Glu Val Lys Tyr
 65 70 75 80
 Phe Ser Phe Pro Gly Glu Leu Leu Met Arg Met Leu Gln Met Leu Val
 85 90 95
 Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Leu Val Thr Gly Met Ala Ala Leu Asp
 100 105 110
 Ser Lys Ala Ser Gly Lys Met Gly Met Arg Ala Val Val Tyr Tyr Met
 115 120 125
 Thr Thr Thr Ile Ile Ala Val Val Ile Gly Ile Ile Ile Val Ile Ile
 130 135 140
 Ile His Pro Gly Lys Gly Thr Lys Glu Asn Met Tyr Arg Glu Gly Lys
 145 150 155 160
 Ile Val Gln Val Thr Ala Ala Asp Ala Phe Leu Asp Leu Ile Arg Asn
 165 170 175

Met Phe Pro Pro Asn Leu Val Glu Ala Cys Phe Lys Gln Phe Lys Thr
180 185 190
Ser Tyr Glu Lys Arg Ser Phe Lys Val Pro Ile Gln Ser Asn Glu Thr
195 200 205
Leu Leu Gly Ala Val Ile Asn Asn Val Ser Glu Ala Met Glu Thr Leu
210 215 220
Thr Arg Ile Arg Glu Glu Met Val Pro Val Pro Gly Ser Val Asn Gly
225 230 235 240
Val Asn Ala Leu Gly Leu Val Val Phe Ser Met Cys Phe Gly Phe Val
245 250 255
Ile Gly Asn Met Lys Glu Gln Gly Gln Ala Leu Arg Glu Phe Phe Asp
260 265 270
Ser Leu Asn Glu Ala Ile Met Arg Leu Val Ala Val Ile Met Trp Tyr
275 280 285
Ala Pro Leu Gly Ile Leu Phe Leu Ile Ala Gly Lys Ile Val Glu Met
290 295 300
Glu Asp Met Gly Val Ile Gly Gly Gln Leu Ala Met Tyr Thr Val Thr
305 310 315 320
Val Ile Val Gly Leu Leu Ile His Ala Val Ile Val Leu Pro Leu Leu
325 330 335
Tyr Phe Leu Val Thr Arg Lys Asn Pro Trp Val Phe Ile Gly Gly Leu
340 345 350
Leu Gln Ala Leu Ile Thr Ala Leu Gly Thr Ser Ser Ser Ser Ala Thr
355 360 365
Leu Pro Ile Thr Phe Lys Cys Leu Glu Glu Asn Asn Gly Val Asp Lys
370 375 380
Arg Ile Thr Arg Phe Val Leu Pro Val Gly Ala Thr Ile Asn Met Asp
385 390 395 400
Gly Thr Ala Leu Tyr Glu Ala Leu Ala Ala Ile Phe Ile Ala Gln Val

	405	410	415
Asn Asn Phe Asp Leu Asn Phe Gly Gln Ile Ile Thr Ile Ser Ile Thr			
420	425	430	
Ala Thr Ala Ala Ser Ile Gly Ala Ala Gly Ile Pro Gln Ala Gly Leu			
435	440	445	
Val Thr Met Val Ile Val Leu Thr Ser Val Gly Leu Pro Thr Asp Asp			
450	455	460	
Ile Thr Leu Ile Ile Ala Val Asp Trp Phe Leu Asp Arg Leu Arg Thr			
465	470	475	480
Thr Thr Asn Val Leu Gly Asp Ser Leu Gly Ala Gly Ile Val Glu His			
485	490	495	
Leu Ser Arg His Glu Leu Lys Asn Arg Asp Val Glu Met Gly Asn Ser			
500	505	510	
Val Ile Glu Glu Asn Glu Met Lys Lys Pro Tyr Gln Leu Ile Ala Gln			
515	520	525	
Asp Asn Glu Pro Glu Lys Pro Val Ala Asp Ser Glu Thr Lys Met			
530	535	540	543

【 0 0 6 1 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図1は、マウスGLAST遺伝子のゲノム構造の概略（制限酵素部位及びエキソン部分）を示す。図中、各記号が示す制限部位に関する制限酵素は以下の通りである。E：E c o R I、B：B a m H I。また、黒ボックスはエキソン（Exon）1～10番を示す。

【圖 2】

図2は、実施例1において、マウスGLAST遺伝子の機能を欠損させるために破壊しようとする標的遺伝子領域（上段）、使用したターゲティングベクター（中
断）、及び破壊されたGLAST遺伝子（下段）の構造を示す。図中、各記号が示す
制限部位に関する制限酵素は以下の通りである。P：PvuII、RV：Eco

oRV、B:BamHI、E:EcoRI、X:XhoI。また、黒ボックスによりエクソン6～8番(E6～8)を示す。neoはネオマイシン耐性遺伝子を、DT-AはジフテリアトキシンAフラグメント遺伝子を示す。

【図3】

図3は、ホモ接合型GLASTノックアウトマウス(GLAST-/-)及び野生型正常マウス(GLAST+/+)の網膜の病理切片像を示す。

【図4】

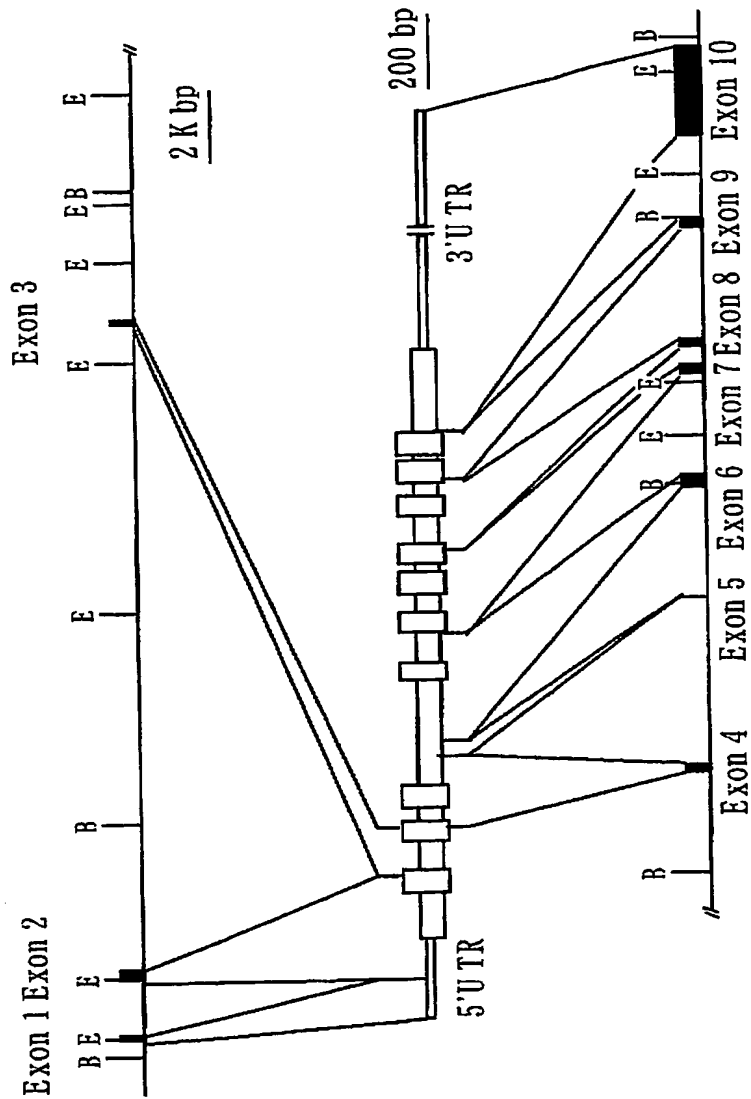
図4は、出生後、指示した週齢における、ホモ接合型GLASTノックアウトマウス(GLAST-/-)、ヘテロ接合型GLASTノックアウトマウス(GLAST+/-)、及び野生型正常マウス(GLAST+/+)の網膜神経節の細胞数を示す。これらの細胞数は、網膜神経節の病理切片内の神経細胞数を、ヘマトキシリン/エオシン染色後に計数した。縦軸は、3～22枚の切片から得られた切片1枚あたりの平均細胞数を表す。横軸は、各マウスの出生後の週齢を表す。

【図5】

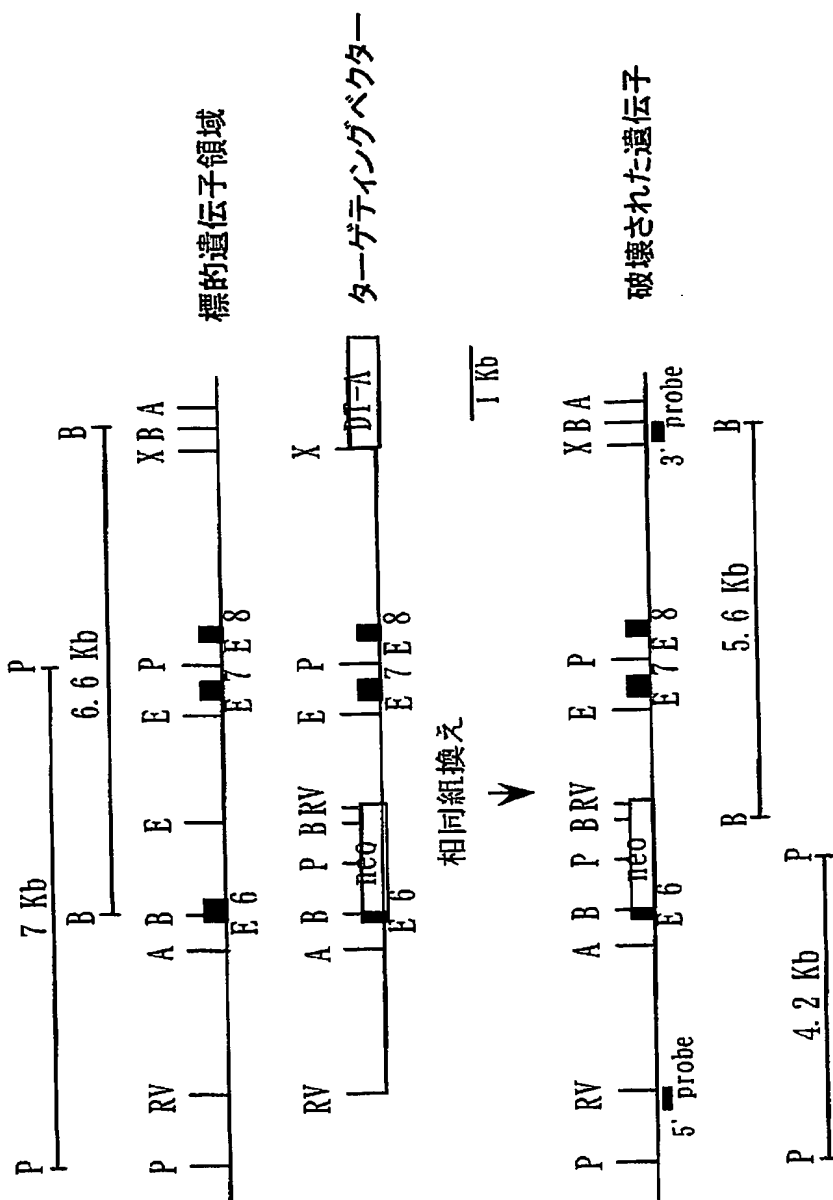
図5は、ホモ接合型GLASTノックアウトマウス(GLAST-/-)及び野生型正常マウス(GLAST+/+)の網膜神経節における、Fluoro-Goldの逆行性ラベリングにより標識された神経細胞を示す蛍光像を示す。

【書類名】 図面

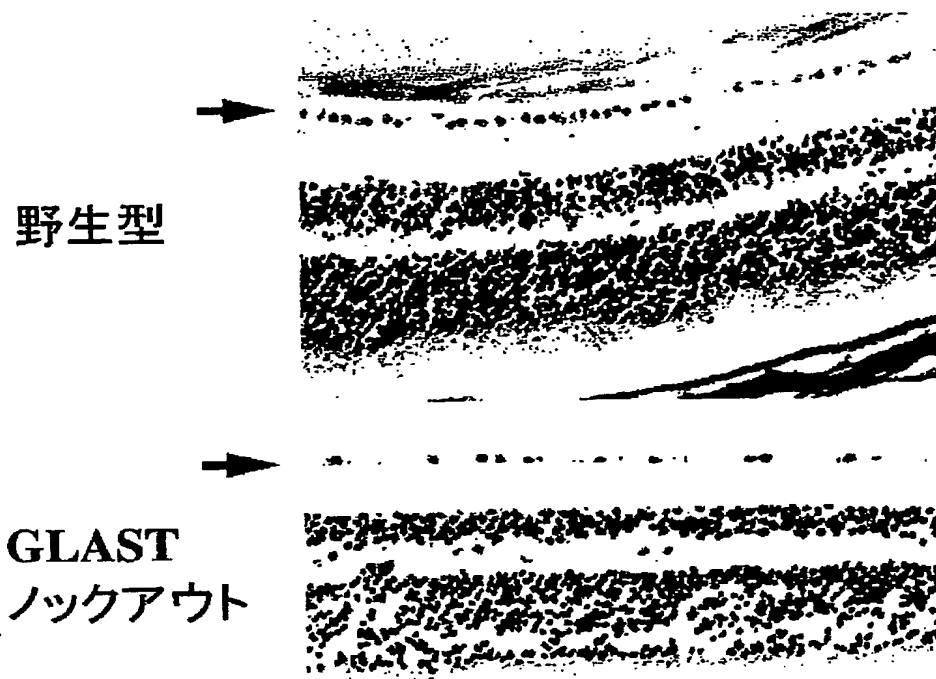
【図1】



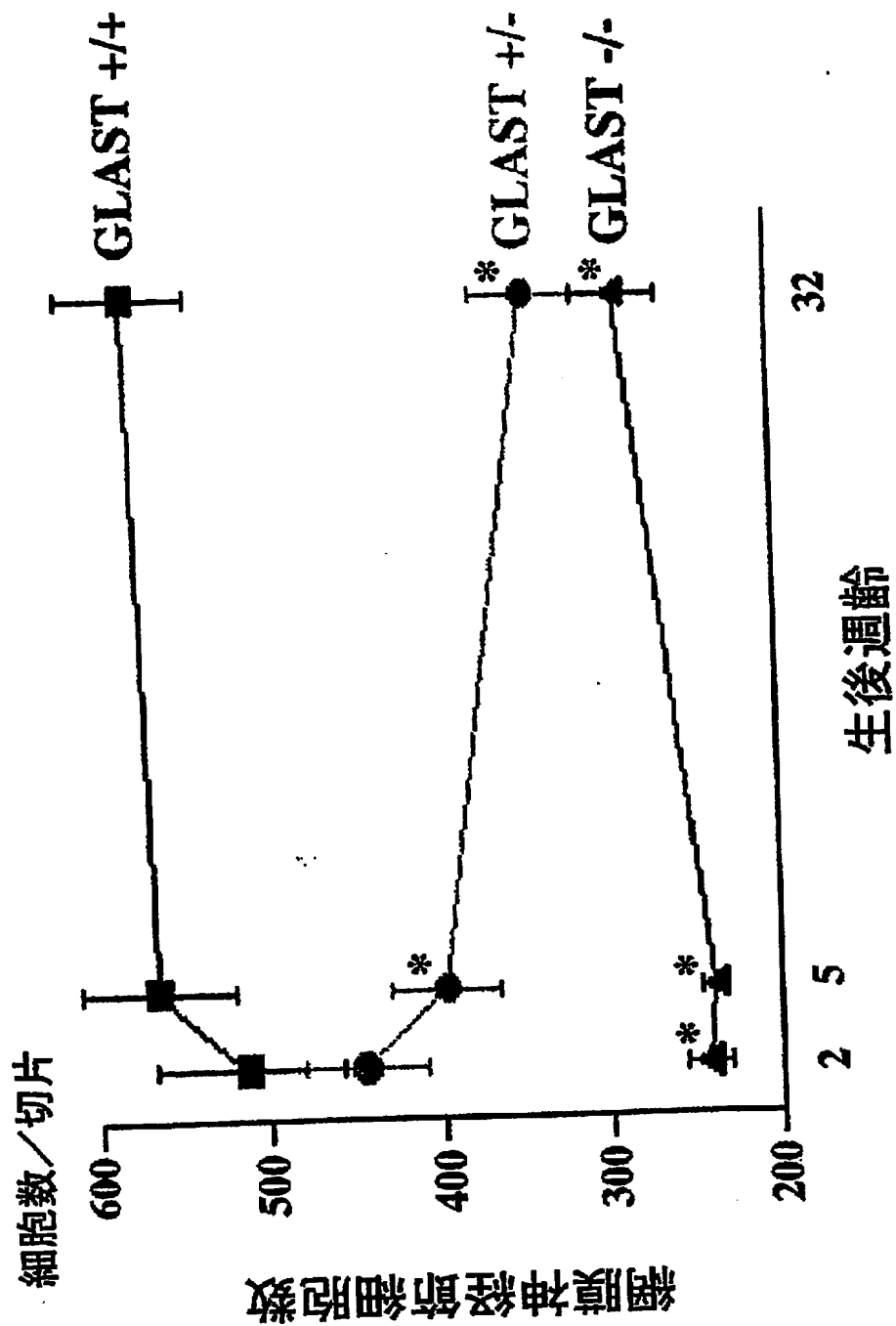
【図 2】



【図 3】

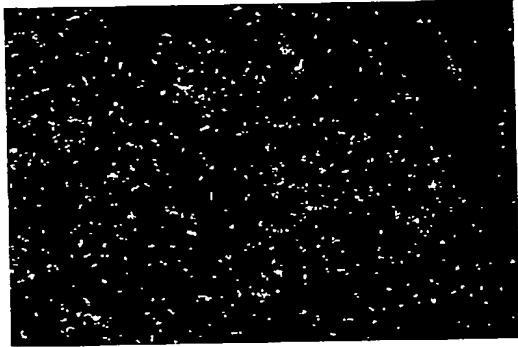


【図 4】

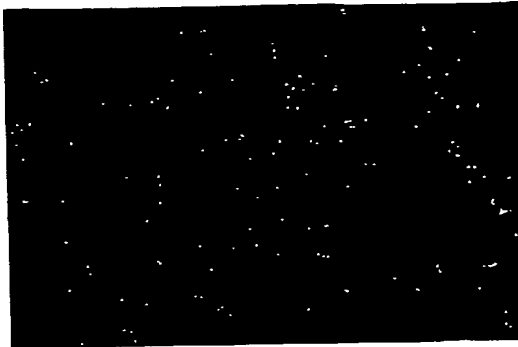


【図 5】

野生型



GLASTノックアウト



【書類名】 要約書**【要約】****【課題】**

正常眼圧緑内障モデルマウス、その作製方法、及びそれを用いた正常眼圧緑内障の治療薬のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】

本発明は、内在性グルタミン酸トランスポーターGLAST遺伝子の機能を欠損させたGLASTノックアウトマウスであって、1) その眼圧が正常範囲にあり、かつ2) その網膜神経節細胞数が、野生型正常マウスに比べて減少している、GLASTノックアウトマウスを提供する。該ノックアウトマウスは、その眼の性状から正常眼圧緑内障モデルとして有用である。また、該ノックアウトマウスを使用することによって、正常眼圧緑内障の治療に有用な化合物をスクリーニングすることもできる。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-114793
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2 0 0 3 - 1 1 4 7 9 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1 9 9 8 年 2 月 2 4 日
名称変更
埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
科学技術振興事業団

特願 2 0 0 3 - 1 1 4 7 9 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日
[変更理由]

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

新規登録

住 所
氏 名

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
独立行政法人 科学技術振興機構